

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

特許第3101690号

(P3101690)

(45) 発行日 平成12年10月23日 (2000. 10. 23)

(24) 登録日 平成12年 8 月25日 (2000. 8. 25)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	
C 0 7 K 16/00		C 0 7 K 16/00	
C 1 2 P 21/00		C 1 2 P 21/00	C
21/08		21/08	
// C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A

請求項の数19(全 18 頁)

(21) 出願番号	特願昭63-502461	(73) 特許権者	999999999 エス・ビー・2・インコーポレイテッド アメリカ合衆国、94526 カリフォルニ ア州、ダンビル、ベッパード・ドラ イブ、905
(86) (22) 出願日	昭和63年 3 月18日 (1988. 3. 18)	(72) 発明者	ウィンター、グレゴリー・ポール イギリス、ケンブリッジ カバンデッ シュ・アベニュー、64
(65) 公表番号	特表平1-502875	(72) 発明者	ダンカン、アレクサンダー・ロバート イギリス、ケンブリッジ ハービー・ロ ード、5
(43) 公表日	平成 1 年10月 5 日 (1989. 10. 5)	(74) 代理人	999999999 弁理士 深見 久郎 (外 3 名)
(86) 国際出願番号	P C T / G B 8 8 / 0 0 2 1 1	審査官	小暮 道明
(87) 国際公開番号	W O 8 8 / 0 7 0 8 9		
(87) 国際公開日	昭和63年 9 月22日 (1988. 9. 22)		
審査請求日	平成 7 年 3 月17日 (1995. 3. 17)		
(31) 優先権主張番号	8 7 0 6 4 2 5		
(32) 優先日	昭和62年 3 月18日 (1987. 3. 18)		
(33) 優先権主張国	イギリス (G B)		
(31) 優先権主張番号	8 7 1 8 8 9 7		
(32) 優先日	昭和62年 8 月10日 (1987. 8. 10)		
(33) 優先権主張国	イギリス (G B)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 変性抗体の、または変性抗体に関する改良

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 アミノ酸残基 234、235、236、237、297、318、320 および 322 からなる群から選択される少なくとも 1 つの定常部 (明細書中に定義される) 中のアミノ酸残基が、異なる残基によって置換されており、それにより、抗原に対する結合性を保持しつつ、未変性の抗体と比較して抗体のエフェクター機能が変まっていることを特徴とする、クラス I g G の変性モノクローナル抗体。

【請求項 2】 未変性の抗体と比較して、エフェクター分子に対する親和性が変わっていることを特徴とする、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】 前記抗体が、天然の抗体、キメラの抗体または変性された抗体であることを特徴とする、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 4】 未変性の抗体と比較して、Fc レセプターに

2

対する結合親和性が変わっていることを特徴とする、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 5】 未変性の抗体と比較して、Fc ガンマ R1 レセプターに対する結合親和性が変わっていることを特徴とする、請求項 4 に記載の抗体。

【請求項 6】 H 鎖のアミノ酸残基 234、235、236 および 237 の少なくとも 1 つが異なる残基によって置換されていることを特徴とする、請求項 5 に記載の抗体。

【請求項 7】 残基 235 が G l u によって置換されていることを特徴とする、請求項 6 に記載の抗体。

【請求項 8】 残基 234、236 および 237 の少なくとも 1 つが A l a によって置換されていることを特徴とする、請求項 6 に記載の抗体。

【請求項 9】 未変性の抗体と比較して、C1 q に対する結合親和性が変わっていることを特徴とする、請求項 1 に

記載の抗体。

【請求項10】 C_{H2} 領域が変更されており、そこにおいてH鎖のアミノ酸残基318、320および322の少なくとも1つが異なる側鎖を有する残基によって置換されていることを特徴とする、請求項9に記載の抗体。

【請求項11】残基318、320および322の少なくとも1つがAlaによって置換されており、C1q結合親和性が減じられていることを特徴とする、請求項10に記載の抗体。

【請求項12】残基318がValによって置換されていることを特徴とする、請求項10に記載の抗体。

【請求項13】残基322がGlnによって置換されていることを特徴とする、請求項10に記載の抗体。

【請求項14】未変性の抗体と比較して、細胞溶解特性が変わっていることを特徴とする、請求項1に記載の抗体。

【請求項15】 C_{H2} 領域が変更されており、そこにおいてH鎖のアミノ酸残基297が変更されていることを特徴とする、請求項14に記載の抗体。

【請求項16】残基297がAlaによって置換されていることを特徴とする、請求項15に記載の抗体。

【請求項17】げっ歯類またはヒトのIgGからなることを特徴とする、請求項1に記載の抗体。

【請求項18】クラスIgGのモノクローナル抗体のエフェクター機能を変える方法であって、アミノ酸残基234、235、236、237、297、318、320および322からなる群から選択される少なくとも1つの定常部（明細書中に定義される）中のアミノ酸残基を異なる残基によって置換し、それにより、抗原に対する結合性を保持しつつ、未変性の抗体と比較して抗体のエフェクター機能を変えることを特徴とする、方法。

【請求項19】未変性の抗体と比較してエフェクター機能が変まっているクラスIgGの変性抗体を製造する方法であって、

a) 抗原に対する結合性を保持しつつ、アミノ酸残基234、235、236、237、297、318、320および322からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸残基が、未変性の抗体の対応するアミノ酸残基と異なっている、IgのH鎖またはL鎖の定常部の少なくとも一部を、コードするDNA配列と動作可能に結合した適当なプロモーターを含む第1の複製可能な発現ベクターを調製する工程、

b) 相補的なIgのL鎖またはH鎖をコードするDNA配列と動作可能に結合した適当なプロモーターを含む第2の複製可能な発現ベクターを必要に応じて調製する工程、

c) 細胞系を、前記第1のベクターまたは前記第1および前記第2の両方のベクターで形質転換する工程、および

d) 前記形質転換された細胞系を培養して、変性抗体を生産する工程

を備えることを特徴とする、製造方法。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は、変性抗体に関し、変性したエフェクター機能を有する抗体、該抗体を生産する方法、および抗体のエフェクター機能を変性する方法に関する。

発明の背景

抗体、すなわち免疫グロブリンは、ジスルフィド結合により連結された2つのH（heavy）鎖と、2つのL（light）鎖からなり、各L鎖は各々のH鎖にジスルフィド結合により結合している。IgGクラス（すなわち、ガンマ（G）クラスの免疫グロブリン（Ig））の抗体の一般構造を添付の第1図に模式的に示す。

各H鎖は一端に1つの可変領域を有し、これに幾つかの定常領域が連なる。各L鎖は一端に1つの可変領域を、他端に1つの定常領域を有し、L鎖の可変領域はH鎖の可変領域と連結し、L鎖の定常領域はH鎖の最初の定常領域と連結する。

抗原は、各対のL鎖およびH鎖の可変領域にある抗原結合部位を介して抗体に結合する。エフェクター分子として知られる他の分子は、この分子の残りの部分における他の部位、すなわち抗原結合部位以外の部位に結合する。本明細書では抗体のこの部分を抗体の「定常部」と呼ぶ。該部位は特にL鎖の端を超えて伸びるH鎖の部分により構成されたFc領域に位置する。

すなわち、本明細書において「定常部」は、抗体における抗原結合部位以外の部分であって、Fc領域に位置し、H鎖により構成される部分を意味する。また、定常部におけるアミノ酸残基の番号は、EUインデックス（後記参考文献、ケイバットら（Kabat et al.），1983年参照）の番号である。

抗体は、エフェクター分子の結合を媒介として数個のエフェクター機能を有する。たとえば、補体のC1成分の抗体に対する結合は補体システムを活性化する。補体の活性化はオプソニン作用および細胞病原体の溶解において重要である。また、補体の活性化は炎症反応を刺激し、自己免疫の過度の感作を引き起こしうる。さらに、抗体は、抗体Fc領域上のFcレセプター部位を細胞上のFcレセプター（FcR）に結合してFc領域を介して細胞に結合する。IgG（ガンマレセプター）、IgE（イータレセプター）、IgA（アルファレセプター）およびIgM（ミューレセプター）を含む別々のクラスの抗体に対して特有の幾つかのFcレセプターが存在する。細胞表面上のFcレセプターに対する抗体の結合は、抗体被覆粒子の食作用（engulfment）および破壊、免疫複合体の浄化、キラー細胞による抗体被覆した標的細胞の溶解（抗体依存性細胞障害（ADCC）と称される）、炎症メディエータの放出、胎盤トランスファーおよび免疫グロブリン生産の制御を含む幾つかの重要で多様な生物学的反応を引き起こす。

さまざまなFcレセプターおよびレセプター部位についてある程度研究されてきたが、それらの位置、構造およ

び機能について未だ多くの未知の事柄がある。

発明の概要

本発明の1つの局面によれば、IgGクラスの変性抗体が提供され、そこにおいて定常部（本明細書にて定義）の少なくとも1つのアミノ酸残基が異なる残基により置換され、抗体のエフェクター機能が未変性の抗体に比較して変化させられている。

抗体のエフェクター機能は、変性により、すなわち、Fcレセプターまたは補体成分のようなエフェクター分子に対する抗体の親和性の強化または減少により、変化させることができる。結合親和性は、一般的にエフェクター分子の結合部位を変化させることにより変わり、この場合では、問題の部位の位置を確認し適当な方法で該部位の少なくとも一部を変化させるのが好ましい。また、エフェクター分子に対する抗体上の結合部位における変化は、全体的な結合親和性の変化を実質的に必要としないが、幾何学的な相互作用を変え、エフェクターの機序を非生産的結合によって無効なものとするところがあることも考えられる。さらに、エフェクター分子結合には直接的に関連せず、エフェクター機能の実行に関連する部位を変化させることにより、エフェクター機能を変えてもよいと考えられる。

抗体のエフェクター機能を変えることにより、免疫反応のさまざまな面を制御すること、たとえば、免疫系のさまざまな反応を強化または抑制することが可能となり、診断および治療において有益な効果が得られる。

たとえば、卵巣および睾丸のガンなどのような幾つかの充実性腫瘍を有する患者の悪性障害の誘導定位（guided localisation）をはかるためにモノクローナル抗体を用いることが知られている。しかしながら、これらの一般的用途は、偽陽性、偽陰性並びに非特異的定位のようないくつかの大きな問題が広がっているため、限定されている。人体への静脈内投与後、その目標となる組織に到達する放射性ヨウ素標識した腫瘍結合（tumour associated）モノクローナル抗体は、少量である（Epenetosら、1986年）。これらの研究における1つの問題として、正常なリンパ節における高い非特異的吸収、およびネズミモノクローナル抗体の速やかな異化がある。また、ヒトモノクローナル抗体の使用は、リンパ管、肝臓および脾臓の高親和性レセプター（FcガンマR I）に対する非特異的結合のため高いバックグラウンドを示すことがある。この高親和性レセプターに結合しない変性モノクローナル抗体は、抗体の特異的な腫瘍への取り込みを増大し、一方FcRへの非特異的結合によるバックグラウンドを低減させることにより、抗体により誘導される腫瘍の定位を改善する。

腫瘍の治療に用いられるモノクローナル抗体は、理想的には放射性的の標識がなされるか、ホスト自身のエフェクター機序の利用が行なわれる。単核細胞、特にK細胞によるADCCは最も効果的と思われる（Halら、1985年）

が、抗体被覆した標的細胞にとって生体内でこれらのいずれが最も重要であるかは未だ明らかでない。あるタイプのFcレセプターのみに反応する抗体を生産することが可能である。たとえば、R.E.Sの細胞の高親和性FcガンマR Iを結合しないが、表面に凝集したときFcガンマR I I発現細胞を結合することができ、ADCCを引き起こしかつ標的細胞を特異的に破壊できる変性抗体を生産できるであろう。

変性抗体の生産は、当業者に周知の技術を含むいかなる適当な技術によって行なってもよい。たとえば、C_H2領域などの関連した抗体の定常領域の形成部または全部など、抗体の適当なタンパク質配列は、適当に変えられた残基を含んで合成することができ、次いで抗体分子の適当な場所に化学的に結合することができる。

しかしながら、遺伝子工学の技術を変性抗体の生産に用いるのが好ましい。現在好ましいこのような技術は次のような工程からなる。

a) 適当な残基が換えられたIgG H鎖のV_H、C_H1、C_H2領域など、IgG H鎖またはL鎖の少なくとも一部をコードするDNA配列と作動可能に結合した適当なプロモーターを含む第1の複製可能な発現ベクターを生産すること、

b) 必要により、相補的Ig L鎖またはH鎖をコードするDNA配列と作動可能に結合した適当なプロモーターを含む第2の複製可能な発現ベクターを生産すること、

c) 第1のまたは両方の調製されたベクターで細胞系を形質転換すること、および

d) 前記形質転換した細胞系を培養し変性抗体を生産すること。

また、本発明は細胞系の形質転換に用いられるベクター、形質転換ベクターの生産に用いられるベクター、形質転換ベクターを用いて形質転換された細胞系、プレバライティブベクターを用いて形質転換された細胞系、およびそれらを生産する方法を包含する。

好ましくは、変性されたエフェクター機能の抗体を生産するべく形質転換される細胞系は、不死化した哺乳動物の細胞系であり、これは有利には、ミエローマ、ハイブリドーマ、トリオーマまたはクアドローマ細胞系のごときリンパ起源のものである。また、該細胞系はエプスタイン・バールウイルスのごときウイルスを用いた形質転換により不死化されたB細胞などの正常なリンパ細胞からなってもよい。最も好ましくは該不死化細胞系はミエローマ細胞系またはその誘導体である。

エフェクター機能に変化した抗体を生産するのに用いられる細胞系は哺乳動物の細胞系であるのが好ましいが、細菌細胞系または酵母細胞系のごとき他のいかなる適当な細胞系をかわりに用いてもよい。特に、E.coli誘導細菌株を用いることも考えられる。

正常状態にある、ある種のミエローマ細胞系のごとき不死化したリンパ細胞系は、分離したIg L鎖を分泌す

10

20

30

40

50

ることが知られている。細胞系が前記方法のステップ a) にて調製されたベクターを用いて形質転換される場合、正常に分泌される鎖が、ステップ a) にて調製されたベクターによりコードされる鎖に対し相補的であるならば、該方法のステップ b) を行なう必要はない。

しかしながら、不死化した細胞系が分泌しないかあるいは相補的な鎖を分泌しない場合、ステップ b) を実行する必要がある。このステップはステップ a) において生産されたベクターをさらに操作することにより行なってもよく、その結果このベクターは H 鎖だけでなく L 鎖をもコードするようになる。別法としては、不死化した細胞系を形質転換するのに用いられる第 2 のベクターを調製することによりステップ b) を実行する。

かかるベクターを生産し、不死化した細胞系の形質転換に用いられる技術は、当業者に公知であり本発明を構成するものではない。

不死化した細胞系が相補的 L 鎖を分泌する場合において、形質転換された細胞系はたとえばベクターを用いて適当な細菌の細胞を形質転換し、次いで該細菌の細胞を不死化した細胞系とスフェロプラスト融合により融合して生産してもよい。別法として、DNA を直接不死化した細胞系にエレクトロポレーション（電気穿孔法）により導入してもよい。

抗体の適当な変えられる部分をコードする DNA 配列は、オリゴヌクレオチド合成により調製することができる。別法として、変えられる部分をコードする DNA をプライマー指定オリゴヌクレオチド位置指定突然変異誘発により調製してもよい。この技術は本質的に、変異点を含有する DNA の一本鎖を用いて所望の変異をコードするオリゴヌクレオチドをハイブリダイズすること、およびオリゴヌクレオチドの延長のための鋳型として該一本鎖を用いて変異を含む鎖を生産することを含む。この技術は、さまざまな形で記載されている [Zoller および Smith (1982 年)、Zoller および Smith (1984 年)、Norris ら (1983 年)、Kramer ら (1982 年)]。

最も単純な形態のこの技術は、さまざまな理由から必ずしも高い頻度で変異を生じるとは限らない。M13 系ベクターにおける単一および複数変異の両方を誘導する改良技術が Carter ら (1985a) により報告されている。

本発明は、異なる種、たとえばヒト、げっ歯類（マウス、ラット、ハムスター）など、および他の綱 (class) の抗体に適用することができる。本発明はまた天然の抗体、キメラの抗体（たとえば PCT/GB85/00392 にて開示のタイプ）、または多の方法 (GB2188638 に開示のタイプ) にて変性した変性抗体に適用することができる。

一例として、IgG について Fc ガンマ R1 として公知のレセプターに対する結合親和性を変える研究がなされた。

ヒトおよびマウスにおいて、3 種の Fc ガンマレセプターは、部分的に Fc ガンマ R1、Fc ガンマ R II、および Fc ガンマ R₃ と呼ばれ、これらは別個に発現されるが造血細

胞型 (hematopoietic cell type) を重複する (Anderson および Looney, 1986 年)。さらに、これら異なるレセプターは IgG サブクラスに対して異なった親和性を有する。前記のごとく、細胞表面のこれらレセプターへの抗体の結合は、数々の重要かつ多様な生物学的反応を引き起こす。存在するどのレセプターがどの効果に対して主に寄与するかは知られていないが、これら生理的な作用に対して関連するのは低親和性レセプターであることが証拠により示唆されている。ヒトおよびマウス中のレセプターは数々の物理的基準に基づき同族体として提案されている。両者由来の低親和性 Fc ガンマ R II のクローニングおよび配列決定は、この仮説 (Lewis ら, 1986 年) を支持する。高親和性レセプター Fc ガンマ R1 は、広範囲にわたり研究されており、ヒトとマウスの両方において単量体 IgG (ヒト = IgG1 および IgG3、マウス = IgG2a) を結合し、同一の細胞型について見い出される。

IgG の Fc 領域は、第 1 図に示すように 2 つの定常領域、C_H2 および C_H3 からなる。マウス系を用いて、相互作用に対する 2 つの領域、C ガンマ 2 および C ガンマ 3 の各々の寄与の決定に多くの努力が払われた。分離された C_H3 領域 (pFc フラグメント) は、単球ロゼットの形成において阻害作用を示さないことが報告されている (Abramson ら, 1970 年)。しかし他の報告では、このフラグメントは Fc ガンマ R1 結合が阻害しうることが示されており (Barnett-Foster ら, 1980 年)、C ガンマ 3 領域はヒト Fc ガンマ R1 の結合に関与していることが示される。この考えは、この阻害活性がプロテイン A と抗-L 鎖のカラムを通すことによる pFc' の広範囲な精製により除去され得ることを Woof らが示すまで支配的となった。これらの精製サンプルは単量体結合の阻害を示さなかった (Woof ら, 1984 年)。さらに、再び C_H3 領域上の抗原決定基に向けられ FcR 結合抗体と相互作用を行なうが、C_H2 上の抗原決定基に向かうものではない、モノクローナル抗体の能力は、C_H2 領域上の結合部位と矛盾しない (Partridge ら, 1986 年)。

また、ヒト単球 (Fc ガンマ R1) 上のヒト IgG に対する高親和性レセプターの広範な研究において、Woof、Burt on らはヒト IgG1 の C_H2 領域に対する結合部位の位置決定を行なった (Woof ら, 1984 年; Partridge ら, 1986 年)。ある範囲の異なる種から得られた IgG サブクラスが、ヒト免疫グロブリンのフラグメントと共に、直接結合マイクロアッセイにおいて、ヒト IgG とヒト単球との間の相互作用を阻害する能力がテストされた。IgG は、ヒト単球上の FcR (Fc ガンマ R1) に対して強い、中間のあるいは弱い結合を示すものに分類された。このような異なる親和性グループのアミノ酸配列の比較により、ヒンジ結合領域 (Leu234-Ser239) の潜在的な単球結合部位が、残基 Gly316-Lys338 により形成される結合屈曲部 (joinin g bend) および 2 つのベータ鎖の可能な関連性ととも

10

20

30

40

50

合部位として提案されている（Burtonら、1980年）。ヒトFcガンマR1レセプターは、ヒトIgG1とマウスIgG2aとを単量体として結合するが、マウスIgG2bの結合は100倍弱い（Woofら、1986年）。ヒンジ結合領域におけるこれらタンパク質の配列の比較は、強い結合中の配列（234から238）Leu-Leu-Gly-Gly-Proがマウスガンマ2bにおいてはLeu-Glu-Gly-Gly-Proになることを示す。

結合親和性を変える試みにおいて、Glu235のLeuによる置換がマウスIgG2bのH鎖中に行なわれた。H鎖中の残基の番号は、EUインデックスの番号である（Kabatら、1983年参照）。正常マウス抗体は、ヒトFcガンマR1に結合しないが、残基235をグルタミン酸からロイシンにたとえ位置指定突然変異誘発にて変えることにより、ヒトFcガンマR1に対する親和性は100倍以上増大する。親和性の増加の大きさは予想以上に大きく、この領域における単一のアミノ酸の変更に、ヒトおよび他の動物の生体内における適用範囲に対してより適合する変性抗体の生産に用いられ得ることを示唆する。この変更は補体成分C1qなどの他のIg結合部位を変化させない。

また、特定の残基をその側鎖上の不適当な機能を有する残基で置換することにより、あるいはGluまたはAspなどの荷電した官能基、あるいはPhe、TyrまたはTrpなどの芳香族非極性残基などを導入することにより、FcガンマR1結合の親和性を変えることも可能である。

これらの変更は、異なる免疫グロブリンの間で配列の相同性が得られるマウス、ヒトおよびラット系に対し等しく適用されると予想される。ヒトFcガンマR1レセプターに結合するヒトIgG3において、Leu235をGluに変えることは、レセプターに対する変異体の相互作用を破壊する。したがって、このレセプターの結合部位をスイッチオン、スイッチオフすることができる。

ヒンジ連結領域における近接または隣接部位についての変異（たとえばAlaによる残基234、236または237の置換）は、残基234、235、236および237における変更がFcガンマR1レセプターに対する親和性に少なくとも影響を与えることを示す。

したがって、本発明の他の局面では、未変性抗体と比較してFcガンマR1に対する結合親和性が変わっている変性Fc領域を有するクラスIgGの変性抗体が提供される。

このような抗体は、残基234、235、236および237に変更を有するのが都合がよい。

異なる態様での免疫反応の制御のために、他のFcレセプターに対する親和性を同様の方法で変えることができる。

さらに他の例として、補体のC1成分の結合に続くIgの細胞溶解特性を変えることも研究された。

補体系、C1の第1成分は実際にはC1q、C1rおよびC1sとして公知の3種類のタンパク質からなり、これらは強く結合している。C1qが3種タンパク質複合体のIgへの結合に対して寄与することがわかった。

分離されたFcフラグメントは、C1qとIgとの相互作用を阻害することがわかった（Yasmeenら、1976年）。

また、C1qの結合はイオン強度に依存し、イオン相互作用が関与することがわかった。

C_q3領域をIg分子の他の部分から切り取ることが可能であり、C_q3領域の欠失によってC1q結合活性はなくなることがわかった（ColumbおよびPorter、1975年）。

C_q2領域をIgから分離することも可能である。このような分離C_q2領域は分離したFcフラグメントと同様にC1qに対して同様の結合親和性を有することがわかった（Isenmanら、1975年）。

このような結果から、C1qに対する結合部位はIgのC_q2領域に位置すると推測される。C1q結合に関与するC_q2領域中の特定のアミノ酸残基を同定するためにさまざまな試みがなされた。最初の手法では、C_q2領域の短い部分に対応する合成ペプチドがC1q結合の阻止のために試された。これによって2つの可能な結合部位が同定された（Boakleら、1975年およびLukasら、1981年）。

第2の手法では、数個のIgC_q2領域の配列の比較が、その三次元構造の研究と共に行なわれた。この結果、C1q結合の部位に関する他の2つの同定案に至った（BrunhouseおよびCebra、1979年；Burtonら、1980年）。

ここで、H鎖のアミノ酸残基318、320および322の少なくとも1つが異なる側鎖を有する残基に変更された、変性したC_q2領域を有する抗体を提供することにより、抗体のC1q結合活性を変化させることができることが見出された。

H鎖中の残基の番号はEUインデックスの番号である（Kabatら、1983年参照）。

本発明者は、以下に述べる特定のC1q結合Igにおいて、318（Glu）、320（Lys）および322（Lys）のいずれか1つの残基をAlaに変えることにより、C1q結合をなくすることが可能であることを見出した。

さらに、これらの残基において変異を起こさせることにより、残基318が水素結合側鎖を有し、かつ残基320および322の両者が正に荷電される側鎖を有する限り、C1q結合が保持されることがわかった。

本出願人は、これら3つの残基はIgGへのC1qの結合に直接関与するであろうと信ずる。しかしながら、またこれら残基は、C1qとの物理的接触には直接関係しない可能性もある。これらの残基は、1つのC_q2領域が、IgG集合体中の隣接領域に対してコンパクトになるのを補助し得、この結果C1q結合にとってともに必要なIgの少なくとも2つの分子を生産し得る。この場合、C1qは全く異なった領域中のIgGと直接接触状態になり得る。しかしながら、本出願人はいずれにせよこれらの理論のいずれかに限定されることを希望するものではない。

従来研究では、残基333（Glu）をC1q結合に関連づけているが、3つの特定の残基に隣接した残基333（Glu）、または3つの特定の残基から離れた残基253（I

e)の変更はC1q結合活性を変えない。

残基318、320および322は、補体結合性であるマウスおよびヒトIgG中に高度に保存されることに注目すべきである。

また、3つの特定の残基の変更は、C1q結合活性を変化させるだけで、抗原結合活性、プロテインA結合活性（プロテインAはC_μ2/C_γインターフェイスに結合する）またはFcマウスマクロファージへの結合能力を変化させないことがわかった。

本発明の方法は、3つの特定の残基のいずれか1つをその側鎖上の不適当な機能を有する残基で置換することによりC1q結合活性をなくすことに用いることができると確信する。C1q結合性をなくすため、イオン性残基をA1aのみで置換することが必須であるわけではない。C1q結合性をなくするため、3つの残基のいずれか1つの代わりに、Gly、Ile、LeuまたはValなどの他のアルキル置換非イオン性残基、あるいはPhe、Tyr、TryおよびProなどの芳香族非極性残基を用いることも可能である。また、C1q結合活性をなくするために、残基320および322（318は除く）の代わりにSer、Thr、CysおよびMetのような極性非イオン性残基を用いることも可能である。

イオン性または非イオン性極性残基上の側鎖は、Glu残基により形成される結合と同様の態様で水素結合を形成することができる。したがって、極性残基による318（Glu）残基の置換によって変性は可能であるが、C1q結合活性をなくすることはできない。

さらにA1aによる297（Asn）の置換は、細胞溶解活性の除去をもたらす、一方C1qに対する親和性をわずかに減少させる（約1/3に弱くなる）ことがわかった。これは、変性がグリコシル化部位を破壊するためであり、かつ補体活性化のために炭水化物の存在が必要であると考えられる。この部位における他の任意の置換もグリコシル化部位を破壊する。

さらに、Lys320のGlnへの変異は、C1qに対する親和性を正常型に比べわずかに弱くするが、非細胞溶解性である。これは、良好なC1q結合が細胞溶解について不十分でありかつおそらくC1qの正確な配向が要求されることを示す。

現在までのすべての抗体イソタイプは、C1q結合モチーフ、またはマウスIgG2b抗体に移植するとき、C1qの結合に効果的な密接に関連したモチーフを備える。明らかに細胞溶解の決定因子が他に存在するはずである。たとえば、短いヒンジおよび低セグメント柔軟性を有する抗体イソタイプは、非細胞溶解性（Oiら、1984年）であり、（a）C1qのモチーフとの相互作用はFabアームによるFcの接近のために立体的にブロックされ得る（Leathbarrowら、1985年）か、または（b）C1qと抗体との相互作用が細胞溶解のために正確な整合を必要としこのためそれ自体幾分柔軟性を必要とすることが示唆される。

次に本発明を添付の図面を参照し実施例により説明す

る。

第1図はIgの構造を示す。

第2図はFcガンマR1結合活性が変化した抗体を生産するために用いるクローニングステップの手順を示す。

第3図はマウスIgGガンマ2b遺伝子の配列を示す。

第4図は、マウスガンマ2b免疫グロブリンによる、U937上の高親和性レセプターに対するブールされた¹²⁵I標識ヒトIgG結合の阻害を示すグラフである。

第5図はU937高親和性レセプターに結合する¹²⁵I-EL235のスク্যাッチャードプロットである。

第6図はヒトガンマ3遺伝子のヌクレオチド配列およびタンパク質配列を示す。

第7図は変異を有するマウスIgG2b抗体のC_μ2領域をコードするヌクレオチド配列、およびいくつかの後記変異体を構成するために用いられるオリゴヌクレオチドの配列を示す。

次にヒトFcガンマR1に対するその親和性を変化させるマウスIgG2bに関する実験について述べる。

抗体の変異および定常領域エキソンをコードするDNAをインビトロで操作し、リンパ細胞系中に再導入することができる（Neuberger、1985年）。pSV-qptに基づくベクター（MulliganおよびBerg、1981年）およびIg鎖プロモーター/エンハンサーを用いると、抗体を発現させ分泌させることができる。このような1つのベクター、pSV-VNP 2b（NeubergerおよびWilliams、1985年）は、ニトロフェニルアセチル（NP）を結合する可変領域および正常マウスIgG2b抗体の定常領域をコードする。このベクターを用いて生産される抗体はヒトFcガンマR1に結合しない。

pSV-VNP 2bベクターの構造の一部を第2（a）図に示す。第2（b）図に示すごとく、該ベクターはSacIを用いて部分的に消化され、C_μ2およびC_μ3の両領域を含むフラグメントは、プラスミドML3K19（Carterら、1985a）においてクローニングされた。

C_μ3領域のN末端のSacI部位は、このN末端にアミノ酸配列を保持するオリゴヌクレオチドを用いた位置指定突然変異誘発により除去された。

次いでC_μ2領域における点変異を、第3図に示すように、塩基956と975との間に示され、EL235と表示される領域において、合成オリゴヌクレオチドを用いて生じさせた。より詳細な変異の構成は以下に述べる。点変異の機構を第2（c）図に示す。

変異C_μ2-C_μ3フラグメントを、pSV-VNP 2bベクターにおいて再クローニングし、正常型C_μ2-C_μ3領域を置換した。変異体pSV-VNP 2bベクターをJ558Lに取り込ませて培養し、抗体を生産し、EL235として知られる抗体変異体をNIP-セファロース上で精製した。

Cガンマ2エキソンにおける変異の構成

変異体は、Carterら（1985a）に記載のとおりML3B19-Cガンマ2/cガンマ3において構成された。この原理お

よび方法は、Carterら（1985a）およびDuncanに詳細に記載されている。

該変異体EL235は、ヒトIgGの結合の阻害およびヒト単球細胞系への直接結合により検定された（Woofら、1984;1986）。ヒト単球細胞系U937上の高親和性Fcレセプターへのブールされた単量体¹²⁵I標識正常ヒトIgGの結合の阻害は、定量的なマイクロアッセイシステムにて測定され、ここで遊離および細胞結合標識は、水-非混和性のオイルを介して遠心分離により分離された。正常型ガンマ2bおよび変異体EL235の結合は、標識したポリクローナルヒトIgGの競合により比較された。第4図はこの実験の阻害曲線を示す。第4図において白丸は正常型を示し、黒丸は変異体EL235を示す。阻害剤の不存在下で¹²⁵I-IgGの結合分率=1となるよう結果を標準化した。変異体は、ヒトIgG1の結合を阻害し、正常型のタンパク質は、阻害活性を示さなかった。放射性標識変異体EL235のU937細胞への直接結合は、結合定数 $3.13 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ を与え（第5図）、同様の実験のブールされたヒトIgGの値と非常に近似している。

第5図はU937高親和性Fcレセプターに結合する¹²⁵I-EL235の典型的なスキッチャードプロットである。細胞のモル当り結合される¹²⁵I-EL235のモル数、 r は次の関係式を用いて計算した。

$$r = \frac{6 \times 10^{23} \times \text{IgG}2b}{\text{細胞の数} / L}$$

式中、IgG2bは結合される¹²⁵I-EL235の濃度である。

Aは遊離の¹²⁵I-EL235の濃度を表わす。プロットの相関係数は0.95であった。

このように点変異は、ヒトFcガンマR1に対するマウスIgG2bの結合親和性を100倍以上変える。

変異を、ヒトガンマ3遺伝子内にて行ない（Huckら、1985年）、Hind III-Sph Iフラグメントを、BamHIリンカーに取り付けた後、最初にM13mp19においてサブクローニングした。次いで、合成オリゴヌクレオチドを前記のごとく使用し、第6図に示すごとく変異：

234LeuからAla

235LeuからGlu

236GlyからAla

237GlyからAla

を形成した。

BamHIフラグメントは、B18抗体の可変領域をコードするHind III-BamHIフラグメントに取り付け（Neuber

gerら、1984および1985に記載）、pSVqptベクター中の発現のためクローニングした。

FcガンマR1における結合についての組替え抗体の性質は、第4図に関連して述べたように競合アッセイにて間接的に決定した。第1表は¹²⁵Iで標識したブールされたヒトIgGのU937細胞に対する結合を阻止するのに必要な抗体の濃度を示す。

第1表

	I_{50} (M)
10 正常型 (Leu234, Leu235, Gly236, Gly237) 変異体	10^{-8}
Ala234	4×10^{-8}
Glu235	10^{-6} より大
Ala236	3×10^{-8}
Ala237	3×10^{-7}

上記の表は、 I_{50} 。（すなわち¹²⁵Iで標識したブールされたヒトIgGの結合分率が0.5となるIgG3の濃度）のおよその値を示す。

これらの結果は、前記のごとく、診断および治療においてマウスおよびヒトの両抗体の使用に関し重要な意味を持つ。

この結果は、FcガンマR1レセプターが選択的にスイッチオンまたはオフされることを示し、これはヒトおよび他の動物のインビボの診断または治療に用いられる抗体の調製に大いに用い得ることを示す。

同様の実験がC1qの結合に続く細胞溶解活性を変化させるためにマウスIgG2bについて行なわれた。さらにpSV-VNP2bベクターの変異体が、前記の方法にて生産され、点変異がC_q2領域中にて合成オリゴヌクレオチドを用いて第7図に示すごとく行なわれ、抗体が前記のごとく生産された。

正常型C_q2-C_q3領域とともに、pSV-VNP2bベクターを用いて生産された抗体は、C1qを結合する（第2表参照）。

得られた精製抗体の特異的NIP-ケファリン誘導ヒツジ赤血球（Weltzienら、1984年）を溶解する能力は、定量的溶血マイクロアッセイ（Youngら、1986年）により測定した。測定結果を第2表に示す。 $\mu\text{g/ml}$ 抗体で表わした力価は、30分後37°Cにおける50%溶解に要する抗体の量を表わす。

変異抗体の数は、NP-Affigel上の抗NP抗体を凝集させた後、放射性標識C1qに対する親和性で試験した（LeatherbarrowおよびDwek、1984年）。この結果も第2表に示す。

第2表

lg G	力価 ($\mu\text{g}/\text{m}\ell$)	親和性 n M
M o l g G 2 b	3	1 0
M o l g M	0 . 1 5	—
M o l g G 1	×	—
M o l g G 2 b の不適当な変異体		
P r o 3 3 1 - A l a	3	—
P r o 3 3 1 - G l y	—	1 2
G l u 3 3 3 - A l a	3	1 2
T h r 3 3 5 - A l a	3	1 0
S e r 3 3 7 - A l a	3	1 1
G l u 2 8 3 - A l a	3	—
H i s 2 8 5 - A l a	3	1 2
H i s 2 9 0 - A l a	3	1 1
G l u 2 9 4 - A l a	3	—
G l u 2 3 5 - A l a	3	—
L y s 2 4 8 - A l a	3	—
I l e 2 5 3 - A l a	3	9
S e r 2 6 7 - A l a	3	—
A s p 2 7 0 - A l a	3	—
G l n 2 7 4 - A l a	3	—
L y s 3 1 7 - A l a	3	—
L y s 2 3 6 - A l a	3	—
L y s 3 4 0 - A l a	3	—

17

18

細胞溶解活性をなくすM o l g G 2 b の変異体

G l u 3 1 8 - V a l	×	
G l u 3 1 8 - A l a	×	3 0 0 より大
L y s 3 2 0 - A l a	×	3 0 0 より大
L y s 3 2 0 - G l n	×	1 3
L y s 3 2 2 - A l a	×	3 0 0 より大
L y s 3 2 2 - G l n	×	-
A s n 2 9 7 - A l a	×	3 1

細胞溶解活性を保持するM o l g G 2 b の変異体

G l u 3 1 8 - T h r	3	1 2
L y s 3 2 0 - A r g	3	1 1
L y s 3 2 2 - A r g	3	1 1

ヒトIgG1およびマウスIgG1に付着するV_H領域を有する抗体は、それぞれエム・ブルゲマン博士(M. Bruggemann)およびピー・ティ・ジョーンズ氏(P.T. Jones)より提供いただいた。

変異体Glu318-A1a、Lys320-A1aおよびLys322-A1aは劇的に親和性が減少した(第2表)。しかしながら、これらはNPハプテンおよびプロテインA(C₄2-C₄3インターフェイスで結合する)に対する結合を保持する。このことから、C1q結合の損失は、抗体の構造変化が主な原因ではないことが示唆される。近接残基(Glu333-A1a)または遠隔の残基(Ile253-A1a)はC1q親和性を保持する。

この結果から、残基318、320および322の側鎖により画定される表面パッチが、IgGがC1qと相互に作用するか否かを決定することが示唆される。これらの残基はヒトおよびマウスIgGにおいて高度に保存され、これら3カ所における側鎖の変更は、補体を活性化しないか、または補体に対する親和性が強化されたヒトC₄2領域の変異体を治療上有用に組み立てるために、用い得ることがわかる。

この表面パッチがC1qに対する完全な結合部位である証拠は、モデル系中でC1q細胞溶解を阻害することを明らかにしたGlu×Lys×Lysモチーフを含むポリペプチド模倣体由来する。この研究は、本出願と同日付にて提出の発明の名称「補体結合ペプチド」として現在係属中のリサーチ・コーポレーションによるPCT出願に記載されている。

本発明は、単に説明のために上記のごとく記載されたにすぎず、変形および変更が、本発明の範囲を逸脱しない限り可能であることがわかる。

参考文献

- アブラムソン、エヌ、ゲルファンド、イー、ダブリュー、ヤンドル、ジェイ、エイチ、およびローゼン、エフ、エス。(Abramson, N., Gelfand, E.W., Jandl, J.H., and Rosen, F.S.)、1970年、J. Exp. Med. 132巻、1207頁
- アンダーソン、シー、エル、およびルーニィ、アール、ジェイ。(Anderson, C.L., and Looney R.J.)、1977年、Immunol. Today, 7巻、264頁
- バーネット・フォスター、ディー、イー、ドーリントン、ケイ、ジェイ、およびベインター、アール、エイチ。(Barnett-Foster, D.E., Dorrington, K.J., and Painter, R.H.)、1980年、J. Immunol. 124巻、2186頁
- ボーケルら(Boakle et al.)、1975年、Nature, 282巻、742~743頁
- ブルンハウスおよびセブラ(Brunhouse and Cebr a) 、1979年、Molec. Immun. 16巻、907~917頁
- バートンら(Burton et al) 、1980年、Nature, 288巻、338~344頁
- バートン、ディー、アール。(Burton, D.R.)、1985年、Molec. Immunol. 22巻、161頁
- バートン、ディー、アール、ボイド、ジェイ、ブランプトン、エイ、イースターブルックスミス、エス、エマニュエル、イー、ジェイ、ノボトニー、ジェイ、レイドマッカー、ディー、ダブリュー、ヴァ

ン、スクラベンデューク、アール、ステルンベルグ、エム、ジェイ、イー、およびドゥエット、アール、エイ、(Burton,D.R.,Boyd,J.,Brampton,A.,Easterbrook-Smith,S.,Emanuel,E.J.,Novotny,J.,Rademacher,T.W.,van Schravendijk,,R.,Sternberg,M.J.E.,and Dwe,t,R.A.)、1980年、Nature、288巻、338頁

カーター、ビー、ベドール、エイチ、およびウインター、ジー、(Carter,P.,Bedouelle,H.,and Winter,G.)、1985a、Nucleic Acids Res、13巻、4431~4443頁

カーター、ビー、ベドール、エイチ、ウェイ、エム、ワイ、およびウインター、ジー、(Carter,P.,Bedouelle,H.,Waye,M.Y.,and Winter,G.)、1985b、In:Oligonucleotide-site-directed mutagenesis in M13.Anglian Biotechnology Limited,Colchester,England.

コロムおよびポーター (Colomb and Porter)、1975年、Biochem J、145巻、177~183頁

ダンカン、エイ、アール、(Duncan A.R.)、University of Cambridge Phe Thesis (to be published)。

エベントス、エイ、スナック、ディー、ダーバン、エイチ、ジョンソン、ビー、およびテイラーパパディミトロ、ジェイ、(Epenetos,A.,Snook,D.,Durbin,H.,Johnson,P.,and Tayler-Papadimitriou,J.)、1986年、Cancer Res、46巻、3183頁

ヘイル、ジー、クラーク、エム、およびウォルドマン、エイチ、(Hale,G.,Clark,M.,and Waldmann,H.)、1985年、Immunol、1134巻、3056頁

ヘイル、ジー、およびウォルドマン、エイチ、(Hale,G.,and Waldmann,H.)、1985年、in Hybridoma Technology in the Biosciences and Medicine.T.Springer,ed.Plenum Press,New York.

フーバー、エイチ、およびフーデンベルグ、エイチ、エイチ、(Huber,H.,and Fudenberg,H.H.)、1968年、Int.Arch.Allergy Appl.Immunol、34巻、18頁

ハックら (Huck et al.)、1985年、Nuc.Acids Res、14巻、1779~1788頁

アイセンマンら (Isenman et al.)、1975年、J.Immun、114巻、1726~1729頁

ケイバットら (Kabat et al.)、1983年、"Sequences of Proteins of Immunological Interest",US Dept. Health and Human Services.

キャロフォノ、エイチ、ビー、およびエベネイト、エイ、(Kalofonos,H.P.,and Epenetos,A.)、1986年、Cancer Treatment Reviews、13巻、243頁

クレイマーら (Kramer et al.)、1982年、Nuc.Acid Res、10巻、6475~6485頁

レザーバロウおよびデック (Leatherbarrow and Dweck)、1984年、Molec Immun、21巻、321~327頁

レザーバロウ、アール、ジェイ、レイドメイチャー、ディー、ダブリュー、デック、アール、エイ、ウォーフ、ジェイ、エム、クラーク、エイ、パート

ン、ディー、アール、リチャードソン、エヌ、およびファンスタン、エイ、(Leatherbarrow,R.J.,Rademacher,T.W.,Dwek,R.A.,Woof,J.M.,Clark,A.,Burton,D.R.,Richardson,N.,and Feinstein,A.)、1985年、Molec,Immun、22巻、407~415頁

ルイス、ブイ、エイ、コック、ティー、ブラトナー、エイチ、およびメルマン、アイ、(Lewis,V.A.,Koch,T.,Plutner,H.,and Hellman,I.)、1986年、Nature、324巻、372頁

ルーカスら (Lukas et al.)、1981年、J.Immun、127巻、2555~2560頁

ムーリガン、アール、シー、およびバーク、ビー、(Mulligan,R.C.,and Berg,P.)、1981年、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、78巻、2072頁

ニューバーガー、エム、エス、およびウィリアムス、ジー、ティー、(Neuberger,M.S.,and Williams,G.T.)、1986年、Phil.Trans.R.Soc.Lond、A317巻、425~432頁

ニューバーガー、エム、エス、ウィリアムス、ジー、ティー、ミッチェル、イー、ビー、ジョホール、エス、エス、フラネーガン、ジェイ、ジー、およびラビッツ、ティー、エイチ、(Neuberger,M.S.,Williams,G.T.,Mitchell,E.B.,Jouhal,S.S.,Flanagan,J.G.,and Rabbitts,T.H.)、1985年、Nature、314巻、268頁

ニューバーガー、エム、エス、ウィリアムス、ジー、ティー、およびフォックス、アール、オー、(Neuberger,M.S.,Williams,G.T.,and Fox,R.O.)、1984年、Nature、312巻、604~608頁

ノリスら (Norris et al.)、1983年、Nuc.Acids Res、11巻、5103~5112頁

オイ、ブイ、ティー、ミンボング、ティー、ハーディ、アール、アール、レイドラー、ジェイ、ダングル、ジェイ、エル、ハーゼンベルグ、エル、エイ、およびストラー (Oi,V.T.,Minh-Vuong,T.,Hardy,R.R.,Reidler,J.,Dangl,J.L.,Herzenberg L.A.and Stryer) 、1984年、Nature、307巻、136~140頁

パートリッジ、エル、ジェイ、ワーフ、ジェイ、エム、ジェフェリー、アール、およびパートン、ディー、アール、(Partridge,L.J.,Woof,J.M.,Jefferis,R.,and Burton,D.R.)、1986年、Molec.Immunol、23巻、1365頁

ラベッチ、ジェイ、ブイ、ラスター、エイ、ディー、ウェインシャンク、アール、コーチャン、エイ、バプロベック、ディー、エイ、ポートノイ、ジェイ、ハルメス、ジェイ、パン、ワイ、エム、シー、アंकレス、ジェイ、(Ravetch,J.V.,Luster,A.D.,Weinshank,R.,Kochan,A.,Pavlovic,D.A.,Portnoy,J.,Hulmes,J.,Pan,Y.M.C.,Unkeless,J.)、1986年、Science、234巻、718頁

サググス、エス、ブイ、ハイロース、ティー、ミ

21

ヤケ, ティー, カワシマ, イー, エイチ, ジョンソン, エム, ジェイ, イタクラ, ケイ, およびウォーレイ, アール, ビー. (Suggs, S.V., Hirose, T., Miyake, T., Kawashima, E.H., Johnson, M.J., Itakura, K., and Wallace, R.B.), 1981年, In: Developmental Biology using Purified Genes (D. Brown, ed.) Academic Press, New York.

ウェルザンら (Weltzien et al.), 1984年, Molec. Immunol., 21巻, 801頁

ワーフ, ジェイ, エム, ジェファア, エム, アイ, ジェフェリー, アール, およびパートン, ディー, アール. (Woof, J.M., Jafaar, M.I., Jefferis, R., and Burton, D.R.), 1984年, Molec. Immun., 21巻, 523頁 *

22

* ワーフ, ジェイ, エム, パートリッジ, エル, ジェイ, ジェフェリー, アール, およびパートン, ディー, アール. (Woof, J.M., Partridge, L.J., Jefferis, R., and Burton D.R.), 1986年, Molec. Immun., 23巻, 319頁

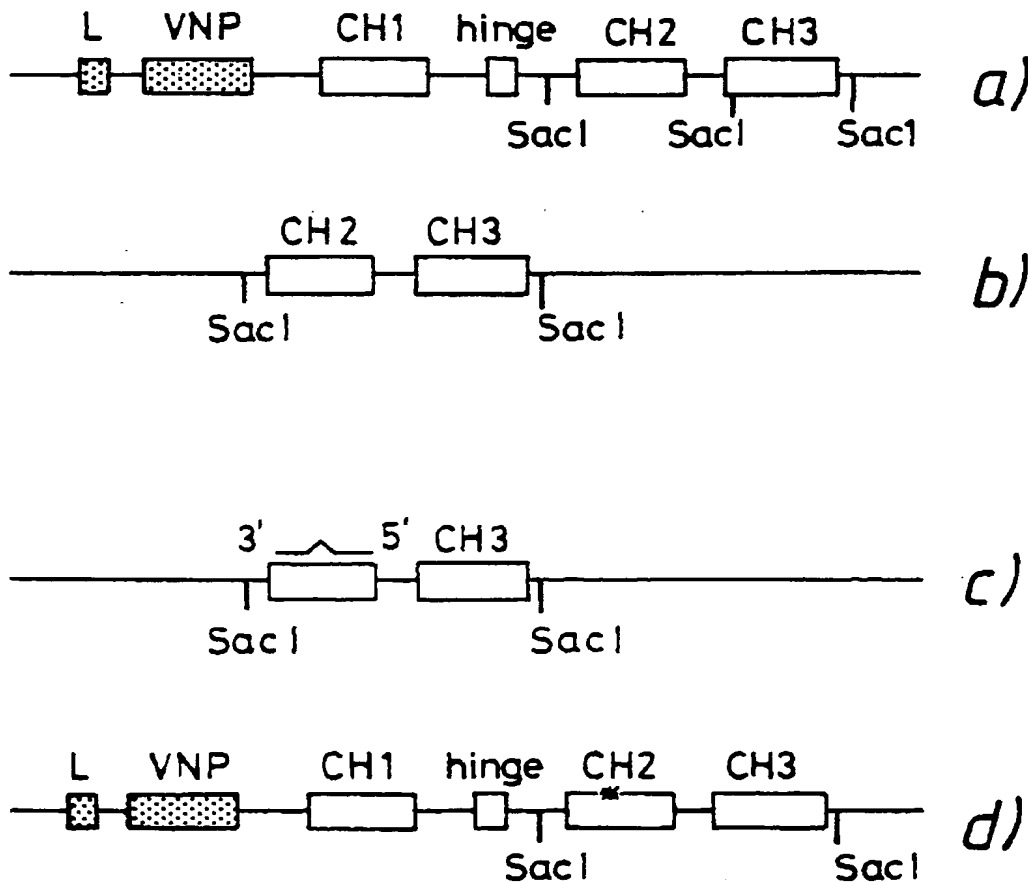
ヤスミーナら (Yasmeen et al.), 1976年, J. Immun., 116巻, 518~522頁

ヤングら (Young et al.), 1986年, Anal. Biochem., 154巻, 649~654頁

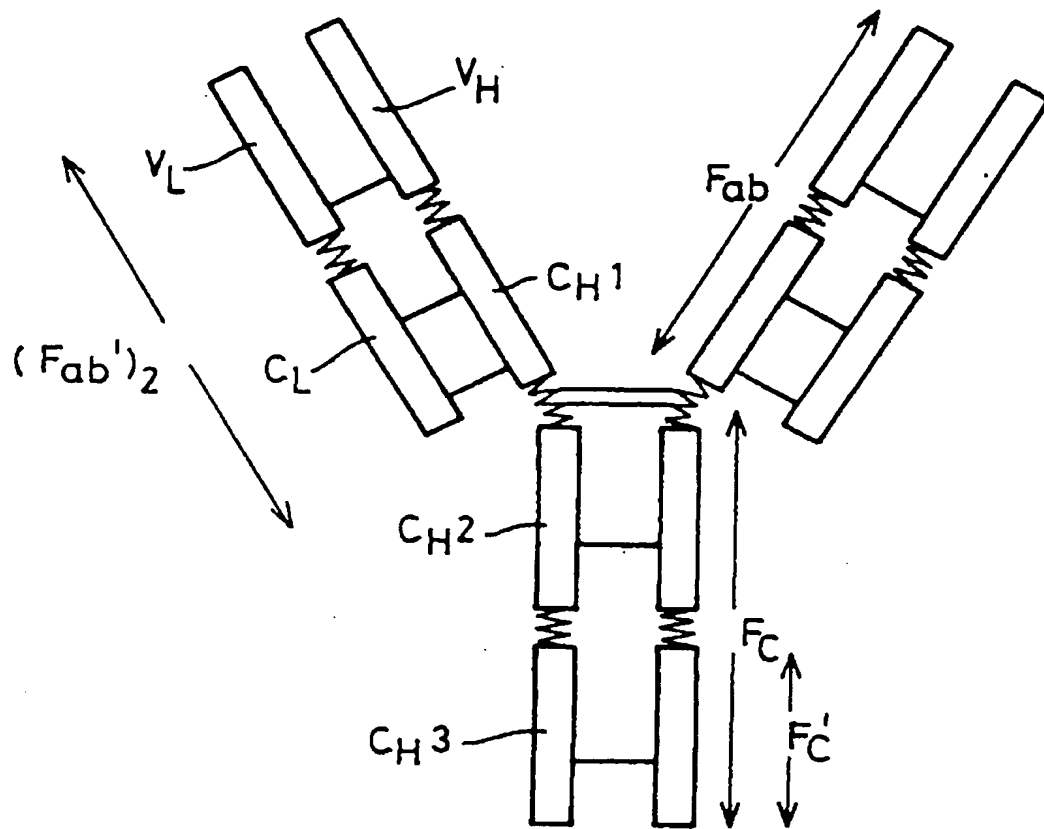
ゾーラーおよびスミス (Zoller and Smith), 1982年, Nuc. Acids Res., 10巻, 6487~650頁

ゾーラーおよびスミス (Zoller and Smith), 1984年, DNA, 3巻, 497~488頁

【第2図】



【第1図】



V

C

L

H

領域

領域間部

ジスルフィド結合

可変

定常

L鎖

H鎖

CH2 domain
A P N

CHI domain

hinge

105

oligo EL235

GGGGACCCACCTGG

【第3B図】

Q I S W F V N N V E V H T A Q T Q T H R E D Y N S T I R V V S T L P I Q H Q D W
 CCAGATCAGCTGCTTGTGAACACCTGGAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACACAGTACTATCCGGGTGGTCCAGCCCTCCCATCCAGCACCAGGACTG
 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200

M S G K E F K C K V N N K D L P S P I E R T I S K I K
 GATGAGTGCACAGGAGTCAATGCAAGGTCAACAAGACCTCCCATCACCCTCGAGAGAACCATCTCAAAAATTAAAGTGGGACCTGCAGGACAACTGCATGGGGCTGGGATG
 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320

CH3 domain SacI (removed)

GGCATPAGANTAAATGCTATGTGGACAGCTTCACCTTCAGCCATGACCTCTATGTATGTTCTTAACCCACAGGGCTAGTCAAGCTGCACAAAGTATACATCTTGCAGCCACAGCAG
 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440

Q L S R K D V S L T C L V V G F N P G D I S V E W T S N G H T E E N Y K D T A P
 AGCAGTTGTCCAGGNAAGATGTCAGTCTCAGTTCGCTGGTGGCTTCAACCTTGGAGACATCAGTGTGGAGCCAGCAATGGGCATACAGAGGAGAACTACAAAGCACCACCGCAC
 1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540 1550 1560

V L D S D G S Y F I Y S K L N M K T S K W E K T D S F S C N V R H E G L K N Y Y
 CAGTCTAGACTCTGACGGTCTTACTTTCATATATAGCAAGCTCAATATGAAACAGCAAGTGGAGAAACAGATTCTCTCATGCAAGGTGAGACAGGAGGCTCTGAAAAATTACT
 1570 1580 1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680

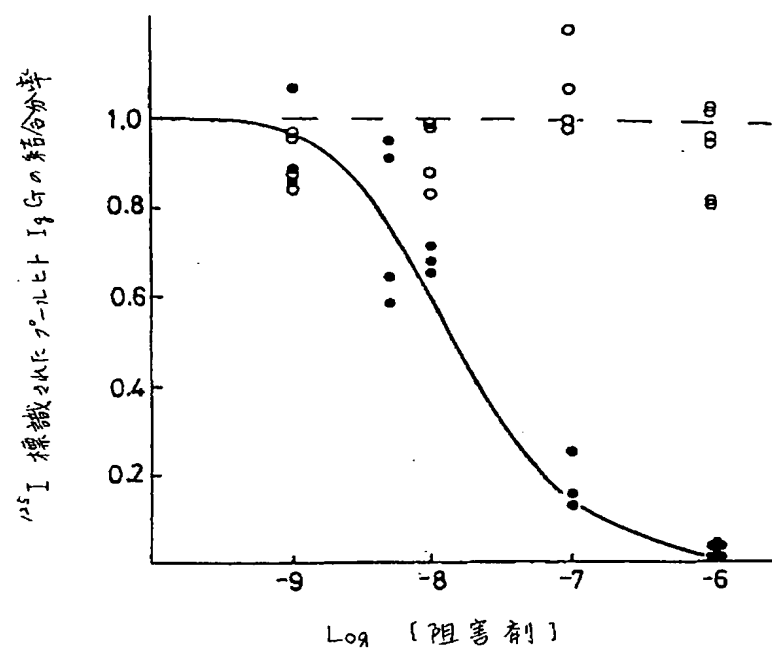
SacI

L K K T I S R S P G K *
 ACCTGAGAGACCATCTCCCGGTCTCCGGGTAAATGAGCTAGCACCCACAAAGCTCTCAGGTCCTAAGAGACACTGGCACCCTATCCATGCCCTTGTTATPAAATAGCATCCAG
 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800

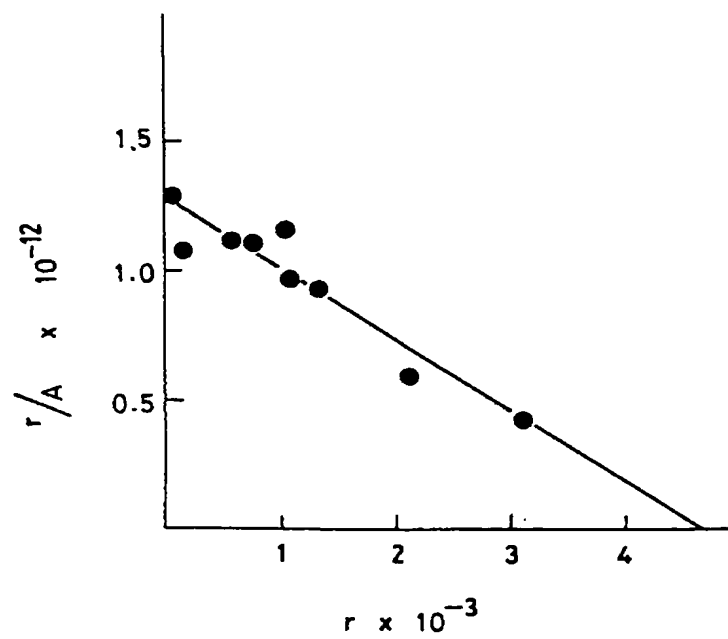
CAAAGCCTGGTACCATGTAAACTGTCTCTTCCAGGTATAGAGCATAGCTCACGGGCTGATAGTCTGCGCCAGGGCCGAGAACAGCCCTTGTTCTATAGGAAGAAATGAGGTT
 1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920

TCTCCCTGCAT
 1930

【第4図】



【第5図】



【第6図】

[illegible]

【第7図】

A P N

CCCTGTAATGGAGGATAAGCCATGTACAAATCCATTTCCATCTCTCCTCATCAGCTCCTA

253

*

L E G G P S U F I F P P N I K D U L M I
 ACCTCGAGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAATATCAAGGATGTACTCATCA
 3' ATGAGTACC

S L T P K U T C U U U D U S E D D P D U
 TCTCCCTGACACCCAGGTCACGTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGACG
GGAGGGACT 5' Ile253-Ala

Q I S W F U N N U E U H T A Q T Q T H R
 TCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATA

297

*

E D Y N S T I R U U S T L P I Q H Q D W
 GAGAGGATTACACAGTACTATCCGGGTGGTCAGCACCCCTCCCATCCAGCACCCAGGACT
 3' TCCTAATGCGGTCATGAT 5' Asn297-Ala

318 320 322

* * *

M S G K E F K C K U N N K D L P S P I E
 GGATGAGTGGCAAGGAGTTCAATGCAAGGTCAACAACAAGACCTCCCATCACCCATCG
 3' CACCGTTCCGGAGT 5' Glu318-Ala 3' TGGGTAGC

3' CCTCAGCGGACGTTCC 5' Lys320-Ala

3' TTACGCGGCAGTTG 5' Lys322-Ala

337

*

R T I S K I K
 AGAGAACCATCTCAAAATTAAGGTGGGACCTGCAGGACA
GGTCTT 5' Glu333-Ala
 3' GGTAGCGGTTTTAA 5' Ser337-Ala

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 8728042
 (32)優先日 昭和62年12月1日(1987. 12. 1)
 (33)優先権主張国 イギリス (GB)
 (72)発明者 バートン, デニス・レイモンド
 イギリス、エス・10、シェフィールド
 カーシック・ヒル・ロード、41

- (56)参考文献 Immunology Letter
s, 1986年, 第12巻, p. 307-312
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981年, 第78巻, 第1号,
p. 524-528
Molecular Immunology, 1984年, 第21巻, 第6号, p.
523-527
Molecular Immunology, 1986年, 第23巻, 第3号, p.
319-330
渡邊武外1名, "ヒト-マウスハイブリッド抗体の作製", 代謝, 1985年, 第
22巻, p. 1601-1610
Nucleic Acid Res.
s., 1982年, 第10巻, 第20号, p.
6487-6500

- (58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
C12N 15/00 - 15/90
BIOSIS (DIALOG)
WPI (DIALOG)
EPAT (QUESTEL)